

| Inventaris Wob-verzoek W16-01 | | | | | | | | | |
|-------------------------------|------------------------------------|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|
| | | wordt verstrekt | | | | weigeringsgronden | | | |
| nr. | document | reeds openbaar | niet | geheel | deels | 10.1.c | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 |
| | NTS2015229 | | | | | | | | |
| 1 | Aanvraagformulier | | | | x | | x | x | |
| 2 | Niet-technische samenvatting | x | | | | | | | |
| 3 | Projectvoorstel | | | | x | | x | x | |
| 4 | Bijlage beschrijving dierproeven | | | | x | | x | x | |
| 5 | DEC-advies | | | | x | | x | x | |
| 6 | Ontvangstbevestiging | | | | x | | x | x | |
| 7 | Mail vragen en antwoorden 8-9-2015 | | | | x | | x | x | |
| 8 | Advies CCD | | x | | | | | | x |
| 9 | Beschikking en vergunning | | | | x | | x | x | |



27 AUG. 2015

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|--------------------------------|--|---|------------|--------------------|-----------------|----------|--------------------|---------------------------------------|----------------|------------|--|-------------|------------|--|
| 1.1 | Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i> | <input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.2 | Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt. | <table border="1"> <tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td></tr> <tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[Redacted]</td></tr> <tr><td>KvK-nummer</td><td>4 1 0 5 5 6 2 9</td></tr> </table> | Naam instelling of organisatie | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [Redacted] | KvK-nummer | 4 1 0 5 5 6 2 9 | | | | | | | | | |
| Naam instelling of organisatie | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [Redacted] | | | | | | | | | | | | | | | | |
| KvK-nummer | 4 1 0 5 5 6 2 9 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.3 | Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | <table border="1"> <tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Geert Groteplein 10</td></tr> <tr><td>Postbus</td><td>9101</td></tr> <tr><td>Postcode en plaats</td><td>6500HB Nijmegen</td></tr> <tr><td>IBAN</td><td>NL90ABNA0231209983</td></tr> <tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>UMC St Radboud</td></tr> </table> | Straat en huisnummer | Geert Groteplein 10 | Postbus | 9101 | Postcode en plaats | 6500HB Nijmegen | IBAN | NL90ABNA0231209983 | Tenaamstelling van het rekeningnummer | UMC St Radboud | | | | | |
| Straat en huisnummer | Geert Groteplein 10 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Postbus | 9101 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Postcode en plaats | 6500HB Nijmegen | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IBAN | NL90ABNA0231209983 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer | UMC St Radboud | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker. | <table border="1"> <tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr> <tr><td>Functie</td><td>PhD student</td><td></td></tr> <tr><td>Afdeling</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr> <tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr> <tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr> </table> | (Titel) Naam en voorletters | [Redacted] | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. | Functie | PhD student | | Afdeling | [Redacted] | | Telefoonnummer | [Redacted] | | E-mailadres | [Redacted] | |
| (Titel) Naam en voorletters | [Redacted] | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. | | | | | | | | | | | | | | | |
| Functie | PhD student | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Afdeling | [Redacted] | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Telefoonnummer | [Redacted] | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E-mailadres | [Redacted] | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.5 | <i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker. | <table border="1"> <tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr> <tr><td>Functie</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr> <tr><td>Afdeling</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr> <tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr> <tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr> </table> | (Titel) Naam en voorletters | [Redacted] | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. | Functie | [Redacted] | | Afdeling | [Redacted] | | Telefoonnummer | [Redacted] | | E-mailadres | [Redacted] | |
| (Titel) Naam en voorletters | [Redacted] | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. | | | | | | | | | | | | | | | |
| Functie | [Redacted] | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Afdeling | [Redacted] | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Telefoonnummer | [Redacted] | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E-mailadres | [Redacted] | | | | | | | | | | | | | | | | |

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- (Titel) Naam en voorletters Dhr. Mw.
- Functie
- Afdeling
- Telefoonnummer
- E-mailadres
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 2 4 . 0 9 . 2 0 1 5
- Einddatum 0 1 . 1 1 . 2 0 1 7
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Imaging in hard tissue eneneering
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Beeldvorming in harde tissue engineering
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 468,00 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- DEC-advies, factuurinformatie

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats Nijmegen

Datum 25 - 08 - 2015

Handtekening [REDACTED]



**Form
Project proposal**

- This form should be used to write the project proposal of animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed
- For more information on the project proposal, see our website(www.zbo-ccd.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

| | | |
|-----|--|--|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Imaging in hard tissue engineering |

2 Categories

| | | |
|-----|---|---|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input checked="" type="checkbox"/> Basic Research <input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research <input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production <input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier <input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures <input type="checkbox"/> Higher education or training |
|-----|---|---|

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

Despite its static aspect, bone is a highly dynamic tissue that undergoes continuous remodeling through osteoclast-mediated erosion activity, versus osteoblast-mediated deposition of new bone. This same process is the reason behind the high regenerative capacity of bone in the healing pathway after a bone fracture. Nevertheless in case of critical size defects, for instance after a tumor resection, bone regeneration is not adequate to achieve complete recovery. In such cases usually a surgical intervention with placement of a graft material is needed. One common treatment for such cases is obtaining autograft bone from an easily accessible site in the body (often from the iliac crest) and the subsequent transplantation of such autologous bone into the defect region. However, the low supply of transplantable bone, the necessity of additional surgery, and the high morbidity at the donor site, incited the scientific community to look for valid alternatives to the bone autograft. Specifically, the development of biocompatible and biodegradable bone substitutes, have opened new frontiers in what nowadays is known as *hard tissue engineering* (hTE) [1].

Among all the commercially available bone substitutes, calcium phosphate cement (CPC) is widely used because of its optimal biological properties. The material resembles natural bone and as such has excellent biocompatibility, and guides new bone formation (osteoconductivity). Furthermore, the injectability of CPC makes this biomaterial useful especially for minimally invasive surgical operations. In that way the material can be injected into places without large surgical intervention, can be applied in locations which are difficult to reach, and after hardening will fit optimally into the defect area [2].

CPC materials are considered as a valid alternative to bone autograft and have found several clinical applications as bone substitute, especially in craniofacial applications, as a bonefiller in osteonecrotic lesions, and as reinforcement for cancellous osteoporotic bone around orthopaedic implants [3,4,5]. Additionally CPCs are widely used as fillers in several dental applications, to accelerate healing process and or provide augmentation around dental implants, and in periodontal pockets [6].

Once implanted in the body, the biomaterial needs to be identified and visualized in order to evaluate the outcome of the surgical procedure. Furthermore the material needs to be followed over the time in order to confirm integration and degradation ratio, and consequently to evaluate the new bone formation, which will end up with a complete bone recovery. Nowadays an increasing number of technologies are used in order to diagnose bone fractures, infections and cancers, such as X-ray, Computer Tomography (CT) and Magnetic Resonance Imaging (MRI) [7]. Moreover, new imaging technologies (e.g. Ultrasound (US), Positron Emission Tomography (PET), Single Photon Emission Computer Tomography (SPECT), Optical Imaging (OI), Photoacoustic Imaging (PI), which so far were mainly used for soft tissues, are finding application also in hard tissues. Also the

combination of these techniques has been investigated in order to obtain more comprehensive and robust information than any single imaging approach. The most commonly used multimodality technologies are, for instance, MRI/CT, PET/CT, MRI/US, SPECT/CT and PET/OI [8]. However, few studies have been performed in order to evaluate the applicability of imaging modalities in hTE, where a potential implanted material needs to be followed longitudinally. Specifically, when CPC is chosen as a bone substitute, several issues can be found because of the high similarity with the natural osseous phase. For instance, due to the high content of calcium salts, CPC has similar radiopacity to bone in conventional X-ray techniques, which means that CPCs are naturally not, or at least not clearly visible on radiographs [7]. In previous studies performed in our laboratory

With this project we want to investigate the possibility to use innovative contrast agents into CPC material, in order to develop an advanced biodegradable material for hard tissue applications (e.g. in bone or teeth), that can be either clearly visualized once implanted in the body and followed over the time. A multimodal imaging approach will be pursued in order to get high sensitivity and high spatial resolution images of the implanted material. It is intended to image the implanted material over the entire time of the (osteoclast mediated) material degradation, and the subsequent (osteoblast mediated) new bone formation. To study whether the imaging indeed is congruent with these phases, we intend to experiment by adding specific growth factors (e.g. RANKL and BMP-2) aimed to modulate the processes of degradation and bone formation.

Therefore we expect that the development of this new biomaterial together with a multimodal imaging approach can allow a better understanding of the material integration and degradation *in vivo*. This does not only enhance the applicability of the current CPC material but will also be facilitating future biomaterial development for hard tissue engineering applications.

This project is

References

1. Stevens M.M., Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today*. 2008 May; 11(5):18-25.
2. Low K.L., Tan S.H., Zein S.H., Roether J.A., Mouriño V., Boccaccini A.R., Calcium phosphate-based composites as injectable bone substitute materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010 Jul; 94(1):273-86.
3. Sariibrahimoglu, K., et al., Injectable biphasic calcium phosphate cements as a potential bone substitute. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2014. 102(3): p. 415-22.
4. Ambard, A.J. and L. Mueninghoff, Calcium phosphate cement: review of mechanical and biological properties. *J Prosthodont*, 2006. 15(5): p. 321-8.
5. Larsson, S., et al., Injectable calcium phosphate cement for augmentation around cancellous bone screws. *In vivo biomechanical studies*. *J Biomech*, 2012. 45(7): p. 1156-60.
6. Xie, C., et al., The use of calcium phosphate-based biomaterials in implant dentistry. *J Mater Sci Mater Med*, 2012. 23(3): p. 853-62.
7. Griffith, J.F. and H.K. Genant, New imaging modalities in bone. *Curr Rheumatol Rep*, 2011. 13(3): p. 241-50.

[REDACTED]

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The aim of this project is to develop a biodegradable material for hard tissue engineering (e.g. bone and teeth) which can be longitudinally imaged with high spatial resolution using different multimodal imaging approaches.

During the last years, in our department [REDACTED], we achieved ample expertise in the field of bone substitutes, especially about calcium phosphate-based materials. Several CPC compositions have already been developed in our laboratory, and the most successful composition has currently been submitted for CE approval. With the advent of new tissue engineering technologies we enlarged our knowledge in the field of the imaging of bone and bone substitutes. This was possible also thanks to the advanced imaging technologies specifically available at the [REDACTED]. Moreover, we already investigated and pursued the possibility to use contrast agents in order to enhance the contrast between the CPC composition and the natural bone phase [1,2]. For such reasons, we believe that we have all the necessary expertise and facilities to successful achieve the main goal of our project.

References

[REDACTED]

3.3 Relevance

What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

Biocompatible and biodegradable biomaterials are necessary as a scaffold for cellular ingrowth, to enhance new tissue regeneration. An ideal combination between non-invasive imaging modality and biomaterial is a prerequisite in hard tissue engineering, especially when multiple scans are needed which can expose the body to high doses of contrast agents or radiation. Multimodal imaging modalities are becoming an useful strategy in order to obtain more detailed functional and anatomical information for a more specific patient diagnosis.

In this context, the development of an innovative biodegradable bone substitute, which can be detected clearly through radiation free technologies (e.g. MRI), would perfectly fit for any hard tissue application. The use of that material can facilitate a better understanding of the implant integration

in the body which eventually can be useful not only for the improvement in material development, but also for a deeper understanding of the pathway behind the processes of material degradation and the new bone formation. All such information can be used in hTE in order to develop materials that can enhance natural bone regeneration and can lead to a faster healing process after a surgical procedure. Furthermore a material that is longitudinally detectable will be an optimal tool for surgeons and dentists who want to evaluate the outcomes of an implant procedure and follow the healing process of the patient over time. This can bring several advantages in term of patient monitoring and health care service, for example the possibility to rapidly identify abnormalities, infections and micro-cracks in the implant material.

3.4 Research Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

Magnetic resonance will be used as primary imaging technique because it is a radiation free methodology. In combination with MRI other imaging modalities, such as μ CT, US, PET, SPECT, OI and PI will be chosen in accordance with a specific contrast agent.

In order to reach the goals of this project our first step (*in vitro* and *ex vivo* experiments) are already completed. A defined CPC composition, already known for its mechanical, degradable and biological properties, was combined with specific biocompatible contrast agents without altering the initial CPC mechanical and biological features. The mechanical and biological properties were checked and validated by *in vitro* experiments (material characterization, mechanical testing, degradation test, cell culture). Once the material was obtained and validated *in vitro*, also *ex vivo* studies were recently performed. Animal bones and teeth were collected from cadavers of animals already used in other experiments (re-use). Through these tests we could optimize the visibility properties of the material required for an optimal imaging in the actual tissue (e.g. determine the right amount and achieve equal distribution of contrast agent). Furthermore this new developed composition was verified to exhibit better imaging properties when compared to the previously developed composition () and does not show any drawbacks, such as the aforementioned blooming effect. The shape of the implanted material can be easily recognized which is an huge improvement compared with the previous composition where the implant could only be localized.

Now that *in vitro* and *ex vivo* studies are performed, animal experiments are requested in order to evaluate the material integration and degradation over the time. For the *in vivo* tests, only the composition is chosen which gave the best performance in terms of mechanical and biological properties and the best outcomes in terms of detectability, quality of the image, intensity of the signal and resolution. Through the *in vivo* study the visibility of the material will be assessed over a specific time that concurs with the material degradation and the consequent new bone formation, which are processes that can not be studied outside of the living organism. This is justified by the fact that the complexity of the pathway behind the material degradation and the new bone formation is not reproducible in an *in vitro* system.

After the implantation *in vivo* (in a surgically created condyle defect) the animals will be scanned at only two specific time points (i.e. according to our previous studies these time points will be 4 weeks and 8 weeks;) and the detectability of the implant will be evaluated. Finally, at the end of the experimental time, the animal will be sacrificed and the femora will be processed for histology in order to evaluate new bone formation.

Once the material is successfully tested *in vivo*, in a new experiment the material with contrast agent will be associated to a specific slow release carrier for growth factors . It is already known that these factors will result in a modulation of the bone healing process.

█ In this way, we will be able to prove that our imaging results are indeed longitudinally detectable and quantification of the signal can be directly correlated to the degradation of the material and subsequent ingrowth of bone.

Considering that a) the duration of each experiment will be approximately 8 months (including material preparation, in vivo experiment, data collection and analysis), b) in the unlucky case of inconveniences we can have some delay, and c) the machines at the PRIME facility are used also by several others operators and therefore they are frequently engaged, we estimate that the project will have to be performed in a step wise manner over a total period of approximately 25 months (i.e. November 2017).

[REDACTED]

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

We will test the new compositions in a small animal model (i.e. Wistar rats), as are most commonly used for bone implants [1, 2, 3, 4]. Bone remodeling will be evaluated by means of the material implantation in the condyle. For this purpose, a cylindrical defect of 3mm in depth and 3 mm in diameter will be surgically created. After implantation the material, degradation will be checked at time points of 4 and 8 weeks, which is based on our previous studies [REDACTED]. Two or more different imaging modalities will be used to detect the material according to the specific contrast agent used (i.e. MRI, CT, US, PI, SPECT, PET and OI).References

1. Muschler G.F., Raut V.P., Patterson T.E., Wenke J.C., Hollinger J.O., *The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine*. Tissue Eng Part B Rev. 2010 Feb;16(1):123-45.
2. American Society for testing and Materials, www.astm.org
3. International organization for Standardization, www.iso.org
4. European Commission, <http://ec.europa.eu>

[REDACTED]

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points

In this project an innovative material composition will be investigated. The material consists of a bone substitute component (always CPC) combined with a specifically designed contrast agent [REDACTED]. The experimental groups will consist of CPC with and without contrast agent. The differences in visualization capacity between the treated (CPC with contrast agent) and control (CPC without contrast agent) groups will be qualitatively and quantitatively evaluated.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

| Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--------------------------|
| 1 | rat condyle defeact |

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

| | | | |
|-----|---|--|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10300 | |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen | |
| 1.3 | List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form. | Serial number 1 | Type of animal procedure rat condyle defeact |

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The CPC composition is combined with different contrast agents ([REDACTED]) by using specific carriers (e.g. microparticles, microcylinders) or chemical reactions. In that way we aim to develop an improved bone substitute that can be clearly and longitudinally visualized once implanted in the body. High resolution and improved imaging quality can give more anatomical and functional information compared with the standard CPC compositions. This will be useful for a better understanding of the process behind the material degradation and the new bone formation, which is critically important for new materials development.

Furthermore, less invasive imaging techniques can overcome the problems related to the prolonged exposition to radiation.

The ability to detect the bone substitute *in vivo* will be evaluated by scanning the implanted material *in situ* using different imaging modalities in accordance with the specific contrast agent (i.e. MRI, CT, SPET, PET, US and PI). Therefore the quality of the image and the resolution that can be obtained will be assessed by comparing images qualitatively, and doing quantitative measurements on image quality.

In order to evaluate the ability to follow the material degradation over the time, the implant will be checked *in situ* with the same imaging techniques at two different time points (e.g. 4 weeks and 8 weeks). This time points were chosen according to external literature as well as to our own previous studies where similar CPCs were evaluated.

Histological analysis will be performed in order to evaluate the new bone formation, in comparison to the images obtained.

[REDACTED]
[REDACTED] Manipulating the healing process with these factors is used to validate the assumption that the data obtained from imaging is indeed in line with the biological responses.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

Defects will be created in the condyle of the rat under general anesthesia. Afterwards the CPC compositions will be injected in the defect and subsequently the subcutaneous tissue and the skin will be closed by sutures. The animals will be anesthetized again at two specific time points (e.g. 4 and 8 weeks post-surgery) in order to perform the imaging scans. At the end of the experimental procedure the animals will be sacrificed and the tissues will be harvested and processed for histology.

A defined calcium phosphate cement (CPC) is chosen as bone filler. [REDACTED]

[REDACTED] To this basic cement composition, contrast agents (CA) will be added.

Firstly,

After these different compositions will be tested *in vivo*, the outcomes will be compared and the material that will give the best performance in terms of detectability, quality of the images, intensity of the signal, resolution and amount of information achievable about degradation of the material and the new bone formation, will be chosen for further *in vivo* investigation: The CPC/contrast agent will be augmented with a slow release carrier for specific factors (). These factors have a very different effect () but taken together in this context (i.e. hard Tissue Engineering) they can induce a faster bone healing.

The experimental procedure consists in different steps:

- Administration of a complete regimen of analgesics and antibiotics.
- Anesthetization of the animals.
- Exposure of the knee joint after a longitudinal parapatellar incision.
- Preparation of a small cylindrical defect in the condyle (3 x 3 mm).
- Injection of the material and closure by suturing.
- Careful monitoring of uneventful wound healing
- Follow-up of the material: at two time points (e.g. 4 and 8 weeks) the defect will be imaged by two/three different imaging modalities under general anesthesia.
- At the end the animal will be euthanized and the femura will be harvested for further histological investigation.

Defect in rat condyle is a well know procedure which is often used to test the biocompatibility of several implantable biomaterials (e.g. metal, ceramics, cements). The femora are easily accessible bone , and only the defect in condyle allows for an enough amount of material to be injected, which can be compared at same time with both cortical and trabecular bone phases. Furthermore this procedure was usually used in previous studies performed in our laboratory. Using the same model we can acquire all the needed expertise to perform this procedure reducing the risk of animal loss or implant failure.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

The samples size determination for the *in vivo* rat study is calculated in line with the requirements of the , and based on the existing literature and the experience of our research group.

In order to define the sample size a power calculation will be performed and the animals will randomly assigned to each group using a computerized random generator (www.random.org).

In order to reduce the number of animals, extensive *in vitro* studies have already been accomplished and used to choose the material which give the best performance in terms of detectability, quality of the image, signal intensity and resolution. We also increased the number of implant per animal as much as possible (i.e. using both legs).

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

Healthy adult male Wistar rats (about 6 weeks old) are chosen as animal model to study our bone substitutes. Based on our previous studies we estimate to use 12 animals for group which means that we need a total of 120 animals for this project. Animals will be purchased from a registered Dutch breeding company.

[REDACTED]

The rat femur is an easily accessible place and the bone is big enough in order to perform cylindrical defects (3x3 mm) which can be injected with a sufficient amount of material. Bilateral defect will be made, however, it is not possible to create the same defect size in other bones (such as the tibia).

Wistar rats are chosen as animal model because they are largely used especially to evaluate the performance of bone substitutes materials and because they can give ideal results in terms of reliability, reproducibility and accuracy. Rats are considered an optimal model especially for primary screenings *in vivo*. Furthermore rats are more ethically accepted compared with other animal models (e.g. dog, sheep and goat). Considering that, *a.* we will use both femora for each rat, *b.* we will have different experimental groups (see the list below), *c.* based on our previous studies *d.* there are two timepoints and *e.* we do not foresee loss of animal exceeding one group size ; we foresee , the maximal number of rats needed is 120.

List of the experimental groups:

[REDACTED]

References

[REDACTED]

6. American Society for testing and Materials, www.astm.org
 7. International organization for Standardization, www.iso.org
 8. European Commission, <http://ec.europa.eu>

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|------------|--------------------|---------------------------|------------------|
| Wistar rat | registered breeder | 120 | 20 weeks maximum |

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

REPLACEMENT. Degradation of-, and new bone formation around a material, can only take place in an animal model in which the material can be

implanted. The determining factors such as a normal circulatory system, movement, wound healing, growth of the bone cells, etc, are such complex processes that they cannot be completely and reliably be reproduced outside of the body system.

MRI scanners that exist for preclinical imaging research can only be used for the mouse or rat. However, the mouse is too small to be able to make a critical (i.e. not spontaneously healing) bone defect. Therefore the animal model selected for the experiments is rat. Rats are the most commonly used animal model in which the materials can be studied, with a high degree of reliability and reproducibility. Rats are considered an optimal model for primary screening *in vivo*. Furthermore rats are more ethically accepted compared with other animal models (i.e. dog, sheep and goats).

REDUCTION. In order to reduce the number of animals a significant effort has been put in testing the new materials in tissues *ex vivo*, in pieces of cadaver bone obtained from dead animals. After the pre-screening tests only the compositions that gave the best performance in terms of detectability, quality of the image, signal intensity and resolution were chosen for the *in vivo* studies. In this way the number of materials to be used *in vivo* is reduced as much as we could.

For all samples size calculation, a power analysis was performed in order to provide the required number of animals to be used.

Additionally we chose to increase the number of implants for each animal as much as we could (i.e. using both legs of the rat) according with the common standard for experimental animal model procedures.

REFINEMENT. The surgical procedure will be performed by expert operators under general anesthesia and antibiotic regimen in order to reduce the pain and other adverse symptoms like infections.

Anesthesia and analgesia protocols are followed as specified in the guidelines of the [REDACTED]. If necessary the experiments will be supplemented in accordance with advice from veterinarians, animal welfare officers, and biotechnicians. The animals will be housed under standard conditions in groups. Animals will be weighed and monitored regularly to avoid unexpected symptoms that can result in animal loss, or alterations of the outcomes.

According with our experience no further discomfort for the animals are expected with exception of the anesthesia and analgesia.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

In order to reduce the stress during the experimental time the animals will be housed in group.

Animals will be observed daily and weighted every week. In the unlucky case of occurrence of unexpected clinical events, that can cause distress or that are difficult to treat, the animals will be euthanized according to the standard procedure (humane endpoint) used for each animal species by the [REDACTED]

Repetition and Duplication

E. Repetition

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

N/A

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

In order to reduce the pain in the animals painkiller will be used according with the expertise of the veterinarians and the biotechnicians of [REDACTED].

Thanks to our expertise and previous studies in this field we already defined an optimized protocol for the implant of materials in condyle defect in rat animal models. Following that protocol the the pain in the animals is reduced as much as we could.

Furthermore the surgical procedure will be performed only by expert operators.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals welfare may be expected?

According to ours previous *in vivo* studies no others adverse effects on the animal welfare are expected. Historically all our animals did non show any problems related to limping, restriction in movement or wound opening. All the animals recover after few hours postsurgery.

The only adverse effects expected are related to the use of anesthesia and analgesia (e.g. suffocation, cessation breathing, hypotermia, tachycardia, arrhythmias, moderate hypotension).

Explain why these effects may emerge.

Cause of adverse effects are related to the use of anesthesia and analgesia (e.g. suffocation, cessation breathing, hypotermia, tachycardia, arrhythmias, moderate hypotension).

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

After the surgical procedure the animals are constantly monitored until they are conscious again and show stable vital signs.

Later on the animals will be observed daily for any signs of surgical complications (i.e. infection, wound opening) and weighted every week.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Prolonged weekly loss of weight (more than 15-20%), wound infection or opening, prolonged diarrhea (>3 days) and general humane endpoints (e.g. severe bleeding, laboured breathing, etc).

Indicate the likely incidence.

The incidence of humane endpoint is very low (< 5%).
Historically we have not had animal loss or unexpected complications.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

The only discomfort forecasted is related to the anesthesia and to the euthanasia injections.
Both surgical procedures can cause a low blood pressure and decrease in respiratory function. The probability for these discomforts is around 100%, therefore we estimate a MODERATE degree of discomfort within the first day after surgery.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

L. Method of killing

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

The animals will be sacrificed at the end of the experimental time. This is necessary in order to harvest the tissues that are needed for histological analysis.

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0035
2. Titel van het project: Imaging in hard tissue engineering.
3. Titel van de NTS: Beeldvorming in harde tissue engineering.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 22-05-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 02-06-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 08-06-2015 tot 25-06-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 25-06-2015
 - advies aan CCD: 24-08-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 08-06-2015
 - Strekking van de vragen:
 - Er staan nog veel taalfouten in deze aanvraag. Wij adviseren u de tekst van deze projectaanvraag nogmaals goed na te kijken met meer aandacht voor het verbeteren van formuleringen (o.a. enkel- of meervoudsvormen, tegenwoordige of verleden tijd), grammatica en spelfouten, en hierbij het vier-ogen-principe toe te passen.
 - **Niet-technische samenvatting:**
 - De woordkeus in onderdeel 3.1 is nog onvoldoende afgestemd op de doelgroep. De onderzoekers worden verzocht dit aan te passen.
 - **Project Proposal:**
 - De titel bevat een spelfout.

-3.1. Uit de gegeven achtergrond wordt onvoldoende duidelijk wel kennishaat de onderzoekers willen vullen met de resultaten van dit onderzoek. Zij schrijven dat er op dit vlak al veelbelovende resultaten zijn (gepubliceerd) maar dat 'Some issues remain unsolved'. Omdat zij niet toelichten welke issues dat zijn blijft de rationale voor het project onduidelijk. Het blijft eveneens onduidelijk waarom zij twee materialen willen ontwikkelen, en waarom zij een experiment met groeifactoren willen doen. De onderzoekers worden verzocht dit te verduidelijken.

-3.4.1.

*De onderzoekers doen er verstandig aan in dit deel van het project aandacht te besteden aan de planning van het onderzoek. Waarom wordt voorzien dat het project tot 1-11-2017 duurt?

*Het gebruik van groeifactoren is nog niet opgenomen in de strategie-beschrijving van het project.

*De verantwoording voor het aantal in vivo te testen materialen en voor de keuze van deze materialen is nog onvoldoende. De onderzoekers worden verzocht dit beter toe te lichten.

- **Description of Animal Procedures:**

-A, eerste vraag. De onderbouwing voor het aantal tijdstippen en de keuze voor deze tijdstippen ontbreekt. De onderzoekers worden verzocht dit toe te voegen.

- A, tweede vraag. De genoemde groeifactoren hebben een zeer verschillende uitwerking. De onderzoekers worden verzocht een keuze te maken en deze te onderbouwen.

-B. Het experimentele design is nog onduidelijk. De onderzoekers worden verzocht te verduidelijken of zij botdefecten in zowel de femora als de tibia maken, en deze keuze te onderbouwen. Bij het aanbrengen van 4 botdefecten kunnen alle condities in één dier onderzocht worden, waardoor de spreiding afneemt en er minder dieren nodig zijn. De onderzoekers worden verzocht de experimentele groepen duidelijker te omschrijven en aan te geven welke combinaties van materialen zij in elke groep willen testen. Ook worden zij verzocht toe te lichten waarom zij in het groeifactor experiment ook de condities 'geen defect' en 'empty defect' opnieuw willen testen. Indien deze controle condities noodzakelijk zijn worden de onderzoekers verzocht het design van het experiment zodanig aan te passen dat de controle condities van de experimenten met en zonder groeifactoren gedeeld kunnen worden.

-K. De omschrijving van de duur van het ongerief als gevolg van de anesthesie en de operatie is niet juist. De onderzoekers worden verzocht dit opnieuw te formuleren.

- Datum antwoord: 25-06-2015

- Strekking van de antwoorden:

- **Niet-technische samenvatting:**

Answer: Zoals voorgesteld is de text aangepast , en sluit deze nu hopelijk wel aan bij de doelgroep.

- **Project Proposal:**

- Answer: The titel is corrected

- -3.1.

Answer: We have added a clear explanation about two main issues that we want to solve in multi modal imaging , which are the blooming effect caused by SPIO particles in MRI; and the short lifetime of gold particles in CT analyses. We agree with reviewer that the initially

mentioned two materials were unclear. Actually we aim to develop only one final material even though in the project this will be tested two different contrast agent compositions. This is now clarified throughout. A coherent explanation about the use of growth factors is included as well.

-3.4.1.

*Answer: we estimated that the total time needed for this project is 25 months ; since there is limited capacity on the PRIME equipment the experiment will likely be executed in smaller runs. With preparation, imaging, and then (histological) processing approximately 7-8 months per step are envisioned hence the end date was set November 2017.

*Answer: changed as suggested; explanation about growthfactors is added in this section.

*Answer: Also see above, there is only one material which will be supplemented with different contrast agents. The number of compositions to be tested is based on the already completed *in vitro* studies on detectability, quality of the image, intensity of the signal and resolution. Explanation has been added to the text.

- **Description of Animal Procedures:**

-A, eerste vraag. Answer: the choice of the time points (i.e. 4 and 8 weeks) comes from literature and from our previous studies. The researcher provided some references for this information in the `Project Proposal` in the section 3.4.1.

-A, tweede vraag. Answer: We want to validate whether our imaging signal is in agreement with the actual degradation of CaP material (by osteoclasts) and formation of bone (by osteoblasts). Therefore we want to use both growth factors because RANKL can induce an osteoclast proliferation that can lead to a faster material degradation, while, from the other side, BMP-2 can induce endogenous bone formation.

-B. Answer: The rat tibia is too small for the proposed cylindrical defect. It does not allow the injection of enough material. The researcher provided a table with the list of the experimental group foreseen and agrees with the reviewer about the fact that the control groups (such as non defect and empty defect) do not need to be repeated when the growth factors will be tested.

-K. Answer: reformulated as requested

- De vragen hebben geleid tot aanpassingen in het projectvoorstel en de beschrijving van de dierproeven.

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Expert advies

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to develop a biodegradable material for hard tissue engineering which can be longitudinally imaged with high spatial resolution using different multimodal imaging approaches.' Calcium fosfaat cement (CPC) wordt veel gebruikt als botvervangend materiaal in de kliniek bij onder meer craniofaciale chirurgie, en orthopaedische en kaakimplantaten. CPC heeft zeer goede biologische eigenschappen, maar is op scans vrijwel niet te onderscheiden van autoloog bot. De onderzoekers willen contrastmateriaal toevoegen aan CPC, waardoor het te zien zal zijn op scans waarbij geen radioactieve straling wordt gebruikt. Het genezingsproces is daardoor beter te volgen op een voor de patiënt minder belastende manier. Tevens wordt door dit onderzoek het effect van toevoeging van groeifactoren aan CPC op de afbraak van dit synthetische materiaal en de vorming van nieuw bot bij ratten duidelijk. Op termijn kunnen de resultaten van dit onderzoek bijdragen aan betere monitoring van patiënten, bijvoorbeeld doordat abnormaliteiten, infecties en haarscheurtjes in of rond een aangebracht implantaat beter zijn te onderkennen. Het beschikbaar komen van een dergelijk materiaal vertegenwoordigt in de ogen van de DEC een substantieel belang.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak zijn verantwoord en kunnen, binnen de gevraagde termijn, leiden tot beantwoording van de gestelde vragen en daarmee tot het behalen van de doelstelling. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven en beschikt over alle benodigde voorzieningen. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over de zichtbaarheid op scans van de onderzochte materialen, en over het effect van het toevoegen van groeifactoren aan deze materialen op de vervanging van het synthetische materiaal door nieuw bot bij ratten.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door het aanbrengen en opvullen van een aantal botdefecten, en de pijn en hinder tijdens de genezing hiervan. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde botoperaties en scans onder anesthesie in als matig. Het cumulatief ongerief voor de dieren is derhalve juist ingeschat in de aanvraag, te weten matig voor alle dieren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De onderdelen van het project die in vitro en ex vivo met behulp van slachtmateriaal uitgevoerd kunnen worden zijn al uitgevoerd. Voor de resterende onderzoeksvragen is het onderzoek in de beschreven diermodellen noodzakelijk. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Er worden twee botdefecten per proefdier aangebracht om het aantal benodigde dieren zo laag mogelijk te houden. De resultaten uit het eerste deel worden gebruikt om het meest veelbelovende materiaal uitgebreider te testen in aanwezigheid van groeifactoren. Het

maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd van het project. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de statistische onderbouwing van het aantal benodigde dieren. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 120 ratten.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. Bij de opzet wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door toepassing van goede pijnbestrijding en anesthesie. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven met betrekking tot de vraag welk contrastmateriaal dat wordt toegevoegd aan CPC leidt tot de beste beelden bij niet-radioactieve imaging, en met betrekking tot de vraag of het effect van toevoeging van groeifactoren meetbaar is. Het is aannemelijk dat dit onderzoek kan bijdragen aan het ontwikkelen van een synthetisch botvervangend materiaal dat beter zichtbaar is op scans. Het belang van het beschikbaar komen van een dergelijk materiaal acht de DEC substantieel, omdat eventuele complicaties bij bijvoorbeeld implantaten beter en sneller zijn vast te stellen met minder belasting van de patiënt.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat de dieren die in dit onderzoek gebruikt worden matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van het aanbrengen en opvullen van botdefecten en de scans. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN (628)



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD103002015229

Bijlagen

2

Datum 28-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 25 augustus 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015229. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan wordt uw aanvraag buiten behandeling gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.zbo-ccd.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Radboud Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 10
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: PhD student
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN (628)

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

Wat mag de gemachtigde doen?

- Een projectvergunning aanvragen
- Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- Alle bovenstaande opties

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

- Nieuwe aanvraag
- Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 24 september 2015
Geplande einddatum: 1 november 2017
Titel project: Imaging in hard tissue engineering
Titel niet-technische samenvatting: Beeldvorming in harde tissue engineering
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen: Melding Machtiging
 DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Nijmegen
Datum: 25 augustus 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN (628)



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD103002015229

Bijlagen

2

Datum 28-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 28 augustus 2015

Vervaldatum: 27 september 2015

Factuurnummer: 201570229

| Omschrijving | Bedrag |
|--|----------|
| Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015229 | € 741,00 |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: dinsdag 8 september 2015 12:36
Aan: info@zbo-ccd.nl [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: Vragen AVD103002015229

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Geachte leden CCD,

Hierbij onze antwoorden tav uw mail dd 4 sept jl.

1) Er zijn drie redenen om mannelijke ratten te gebruiken. Ten eerste, is het bekend dat mannen een betrouwbaardere opzet vormen omdat de botheling niet beïnvloed wordt door hormonale schommelingen. Ten tweede zijn in vrijwel alle eerdere literatuur referenties waarin dit model gebruikt wordt, ook mannelijke dieren gebruikt. Voor de vergelijkbaarheid met de wetenschappelijke literatuur is dus ook het gebruik van mannelijke dieren gewenst. Tenslotte, is er nog een praktische reden; nl. de grootte van de femorale condyl is verschillend tussen mannelijke en vrouwelijke dieren. Het is alleen in mannelijke dieren goed mogelijk om het voorgestelde botdefect te prepareren [Ref. Tissue Eng Part C Methods. 2014 Jun;20(6):493-505].

2) Verzoek om het aantal dan aan te passen naar 108

3) Leges zijn verstuurd, met factuurnummer 201570229 op 2 sept jl.

Vr Groet namens de aanvragers,

[REDACTED]

Kind regards,

[REDACTED]

Radboud universitair medisch centrum

[REDACTED]
Shipping address: P.O.Box 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED], The Netherlands
Street address: [REDACTED], The Netherlands

All my publications: [REDACTED]

Department website: [REDACTED]

Present: Monday / Tuesday / Thursday / Friday

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]

Verzonden: vrijdag 4 september 2015 16:26

Aan: [REDACTED]

CC: [REDACTED]

Onderwerp: Vragen AVD103002015229

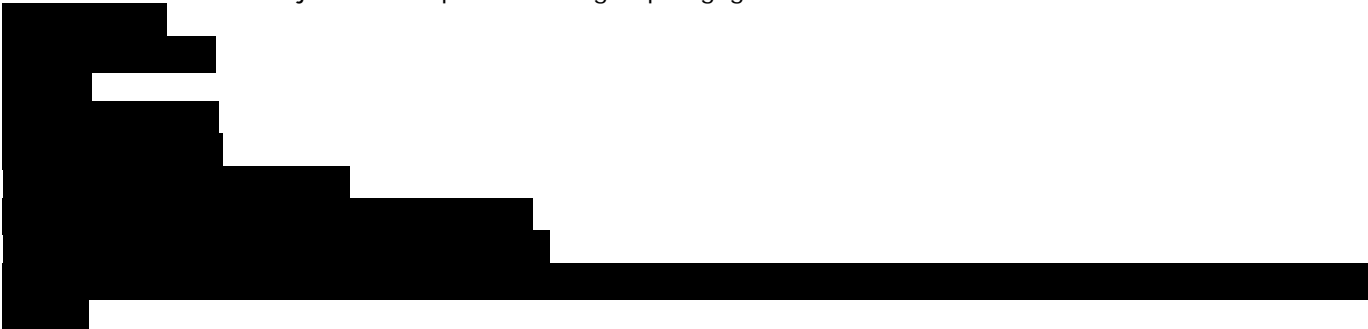
Geachte meneer [REDACTED]

Op 25 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Imaging in hard tissue engineering" met aanvraagnummer AVD103002015229.

Er zijn nog enkele zaken onduidelijk.

U geeft aan mannelijke ratten te willen gebruiken. Is het mogelijk ook vrouwelijke dieren te gebruiken, of kunt u aangeven waarom dat niet mogelijk is?

In uw Beschrijving Dierproeven beschrijft u dat er 12 ratten per groep worden gebruikt. U komt dan op 120 ratten in totaal. Er wordt een lijst van 9 experimentele groepen gegeven:



9 x 12 = 108. Hoe komt u aan 120 ratten?

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Zoals in de factuur staat, moeten de leges binnen 30 dagen door ons zijn ontvangen. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via e-mail. Om uw aanvraag in de volgende vergadering te kunnen bespreken, vraag ik u om uiterlijk **15 september 2015** te reageren.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat uw aanvraag compleet is. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Met vriendelijke groeten,
Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

.....
T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)

E: info@zbo-ccd.nl

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629. The Radboud university medical center is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD103002015229

23 SEP. 2015

Datum

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 25 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Imaging in hard tissue engineering" met aanvraagnummer AVD103002015229. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 8 september 2015 heeft u uw aanvraag aangevuld. Het aantal dieren is aangepast en er is gevraagd naar de te gebruiken geslachten.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project "Imaging in hard tissue engineering" starten. De vergunning wordt afgegeven van 24 september 2015 tot en met 1 november 2017.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 24 augustus 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

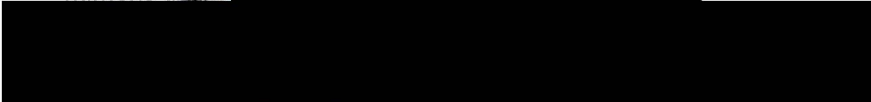
<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze: 


Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Vergunning
- Hiervan deel uitmakend:
 - DEC-advies
 - Weergave wet- en regelgeving

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Radboud Universiteit Nijmegen
Adres: Postbus 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 24 september 2015 tot en met 1 november 2017, voor het project "Imaging in hard tissue engineering" met aanvraagnummer AVD103002015229, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is PhD student. Voor de uitvoering van het project is [REDACTED] verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 25 augustus 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 25 augustus 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 25 augustus 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 24 augustus 2015, ontvangen op 25 augustus 2015.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 8 september 2015

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|---------------------|--|----------------------|------------------|--------------------|
| rat condyle defeact | Ratten (Rattus norvegicus) / adult male Wistar (about 6 weeks old) | 108 | Matig / moderate | |

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een

doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier

niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand..

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0035
2. Titel van het project: Imaging in hard tissue engineering.
3. Titel van de NTS: Beeldvorming in harde tissue engineering.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 22-05-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 02-06-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 08-06-2015 tot 25-06-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 25-06-2015
 - advies aan CCD: 24-08-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 08-06-2015
 - Strekking van de vragen:
 - Er staan nog veel taalfouten in deze aanvraag. Wij adviseren u de tekst van deze projectaanvraag nogmaals goed na te kijken met meer aandacht voor het verbeteren van formuleringen (o.a. enkel- of meervoudsvormen, tegenwoordige of verleden tijd), grammatica en spelfouten, en hierbij het vier-ogen-principe toe te passen.
 - **Niet-technische samenvatting:**
 - De woordkeus in onderdeel 3.1 is nog onvoldoende afgestemd op de doelgroep. De onderzoekers worden verzocht dit aan te passen.
 - **Project Proposal:**
 - De titel bevat een spelfout.

-3.1. Uit de gegeven achtergrond wordt onvoldoende duidelijk wel kennishiaat de onderzoekers willen vullen met de resultaten van dit onderzoek. Zij schrijven dat er op dit vlak al veelbelovende resultaten zijn (gepubliceerd) maar dat 'Some issues remain unsolved'. Omdat zij niet toelichten welke issues dat zijn blijft de rationale voor het project onduidelijk. Het blijft eveneens onduidelijk waarom zij twee materialen willen ontwikkelen, en waarom zij een experiment met groeifactoren willen doen. De onderzoekers worden verzocht dit te verduidelijken.

-3.4.1.

*De onderzoekers doen er verstandig aan in dit deel van het project aandacht te besteden aan de planning van het onderzoek. Waarom wordt voorzien dat het project tot 1-11-2017 duurt?

*Het gebruik van groeifactoren is nog niet opgenomen in de strategie-beschrijving van het project.

*De verantwoording voor het aantal in vivo te testen materialen en voor de keuze van deze materialen is nog onvoldoende. De onderzoekers worden verzocht dit beter toe te lichten.

- **Description of Animal Procedures:**

-A, eerste vraag. De onderbouwing voor het aantal tijdstippen en de keuze voor deze tijdstippen ontbreekt. De onderzoekers worden verzocht dit toe te voegen.

- A, tweede vraag. De genoemde groeifactoren hebben een zeer verschillende uitwerking. De onderzoekers worden verzocht een keuze te maken en deze te onderbouwen.

-B. Het experimentele design is nog onduidelijk. De onderzoekers worden verzocht te verduidelijken of zij botdefecten in zowel de femora als de tibia maken, en deze keuze te onderbouwen. Bij het aanbrengen van 4 botdefecten kunnen alle condities in één dier onderzocht worden, waardoor de spreiding afneemt en er minder dieren nodig zijn. De onderzoekers worden verzocht de experimentele groepen duidelijker te omschrijven en aan te geven welke combinaties van materialen zij in elke groep willen testen. Ook worden zij verzocht toe te lichten waarom zij in het groeifactor experiment ook de condities 'geen defect' en 'empty defect' opnieuw willen testen. Indien deze controle condities noodzakelijk zijn worden de onderzoekers verzocht het design van het experiment zodanig aan te passen dat de controle condities van de experimenten met en zonder groeifactoren gedeeld kunnen worden.

-K. De omschrijving van de duur van het ongerief als gevolg van de anesthesie en de operatie is niet juist. De onderzoekers worden verzocht dit opnieuw te formuleren.

- Datum antwoord: 25-06-2015

- Strekking van de antwoorden:

- **Niet-technische samenvatting:**

Answer: Zoals voorgesteld is de text aangepast , en sluit deze nu hopelijk wel aan bij de doelgroep.

- **Project Proposal:**

- Answer: The titel is corrected

- -3.1.

Answer: We have added a clear explanation about two main issues that we want to solve in multi modal imaging , which are the blooming effect caused by SPIO particles in MRI; and the short lifetime of gold particles in CT analyses. We agree with reviewer that the initially

mentioned two materials were unclear. Actually we aim to develop only one final material even though in the project this will be tested two different contrast agent compositions. This is now clarified throughout. A coherent explanation about the use of growth factors is included as well.

-3.4.1.

*Answer: we estimated that the total time needed for this project is 25 months ; since there is limited capacity on the PRIME equipment the experiment will likely be executed in smaller runs. With preparation, imaging, and then (histological) processing approximately 7-8 months per step are envisioned hence the end date was set November 2017.

*Answer: changed as suggested; explanation about growthfactors is added in this section.

*Answer: Also see above, there is only one material which will be supplemented with different contrast agents. The number of compositions to be tested is based on the already completed *in vitro* studies on detectability, quality of the image, intensity of the signal and resolution. Explanation has been added to the text.

- **Description of Animal Procedures:**

-A, eerste vraag. Answer: the choice of the time points (i.e. 4 and 8 weeks) comes from literature and from our previous studies. The researcher provided some references for this information in the 'Project Proposal' in the section 3.4.1.

-A, tweede vraag. Answer: We want to validate whether our imaging signal is in agreement with the actual degradation of CaP material (by osteoclasts) and formation of bone (by osteoblasts). Therefore we want to use both growth factors because RANKL can induce an osteoclast proliferation that can lead to a faster material degradation, while, from the other side, BMP-2 can induce endogenous bone formation.

-B. Answer: The rat tibia is too small for the proposed cylindrical defect. It does not allow the injection of enough material. The researcher provided a table with the list of the experimental group foreseen and agrees with the reviewer about the fact that the control groups (such as non defect and empty defect) do not need to be repeated when the growth factors will be tested.

-K. Answer: reformulated as requested

- De vragen hebben geleid tot aanpassingen in het projectvoorstel en de beschrijving van de dierproeven.

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Expert advies

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to develop a biodegradable material for hard tissue engineering which can be longitudinally imaged with high spatial resolution using different multimodal imaging approaches.' Calcium fosfaat cement (CPC) wordt veel gebruikt als botvervangend materiaal in de kliniek bij onder meer craniofaciale chirurgie, en orthopaedische en kaakimplantaten. CPC heeft zeer goede biologische eigenschappen, maar is op scans vrijwel niet te onderscheiden van autoloog bot. De onderzoekers willen contrastmateriaal toevoegen aan CPC, waardoor het te zien zal zijn op scans waarbij geen radioactieve straling wordt gebruikt. Het genezingsproces is daardoor beter te volgen op een voor de patiënt minder belastende manier. Tevens wordt door dit onderzoek het effect van toevoeging van groeifactoren aan CPC op de afbraak van dit synthetische materiaal en de vorming van nieuw bot bij ratten duidelijk. Op termijn kunnen de resultaten van dit onderzoek bijdragen aan betere monitoring van patiënten, bijvoorbeeld doordat abnormaliteiten, infecties en haarscheurtjes in of rond een aangebracht implantaat beter zijn te onderkennen. Het beschikbaar komen van een dergelijk materiaal vertegenwoordigt in de ogen van de DEC een substantieel belang.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak zijn verantwoord en kunnen, binnen de gevraagde termijn, leiden tot beantwoording van de gestelde vragen en daarmee tot het behalen van de doelstelling. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven en beschikt over alle benodigde voorzieningen. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over de zichtbaarheid op scans van de onderzochte materialen, en over het effect van het toevoegen van groeifactoren aan deze materialen op de vervanging van het synthetische materiaal door nieuw bot bij ratten.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door het aanbrengen en opvullen van een aantal botdefecten, en de pijn en hinder tijdens de genezing hiervan. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde botoperaties en scans onder anesthesie in als matig. Het cumulatief ongerief voor de dieren is derhalve juist ingeschat in de aanvraag, te weten matig voor alle dieren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De onderdelen van het project die in vitro en ex vivo met behulp van slachtmateriaal uitgevoerd kunnen worden zijn al uitgevoerd. Voor de resterende onderzoeksvragen is het onderzoek in de beschreven diermodellen noodzakelijk. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Er worden twee botdefecten per proefdier aangebracht om het aantal benodigde dieren zo laag mogelijk te houden. De resultaten uit het eerste deel worden gebruikt om het meest veelbelovende materiaal uitgebreider te testen in aanwezigheid van groeifactoren. Het

maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd van het project. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de statistische onderbouwing van het aantal benodigde dieren. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 120 ratten.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. Bij de opzet wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door toepassing van goede pijnbestrijding en anesthesie. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven met betrekking tot de vraag welk contrastmateriaal dat wordt toegevoegd aan CPC leidt tot de beste beelden bij niet-radioactieve imaging, en met betrekking tot de vraag of het effect van toevoeging van groeifactoren meetbaar is. Het is aannemelijk dat dit onderzoek kan bijdragen aan het ontwikkelen van een synthetisch botvervangend materiaal dat beter zichtbaar is op scans. Het belang van het beschikbaar komen van een dergelijk materiaal acht de DEC substantieel, omdat eventuele complicaties bij bijvoorbeeld implantaten beter en sneller zijn vast te stellen met minder belasting van de patiënt.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat de dieren die in dit onderzoek gebruikt worden matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van het aanbrengen en opvullen van botdefecten en de scans. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.